

Aus dem Charité Centrum 5 für Diagnostische und Präventive Labormedizin
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie

Dissertation

Einsatz dynamischer Fluoreszenz-Flowzytometrie- Parameter zur Diagnostik von Anämien und Sepsis sowie zur Mortalitätsprädiktion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

PD Dr. med. Dipl. biochem. Andreas Weimann, MHBA

aus Wien

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 KURZDARSTELLUNG / ABSTRACT	3
2 EINFÜHRUNG	5
3 METHODIK	8
3.1 Der Hämaplot zur Differentialdiagnostik und Therapieüberwachung von anämischen Patienten	8
3.2 Der „Intensive Care Infection Score“ zur Differenzierung von infektiösen von nicht-infektiösen Prozessen und Therapieüberwachung bei Patienten mit SIRS und Sepsis	9
3.3 Erythroblasten im peripheren Blut als Mortalitätsprädiktor bei Neugeborenen	10
4 ERGEBNISSE	11
4.1 Der Hämaplot zur Differentialdiagnostik und Therapieüberwachung von anämischen Patienten	11
4.2 Der „Intensive Care Infection Score“ zur Differenzierung von infektiösen von nicht-infektiösen Prozessen und Therapieüberwachung bei Patienten mit SIRS und Sepsis	12
4.3 Erythroblasten im peripheren Blut als Mortalitätsprädiktor bei Neugeborenen	13
5 DISKUSSION	14
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	17
7 LITERATURVERZEICHNIS	19
8 ANTEILSERKLÄRUNG MIT EIDESSTATTLICHER VERSICHERUNG	21
9 AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN	23
9.1 Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia	23
9.2 Intensive Care Infection Score - A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients.....	35
9.3 Nucleated red blood cells as marker for an increased risk of unfavorable outcome and mortality in very low birth weight infants	53
10 LEBENS LAUF	59
11 KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE	62
12 DANKSAGUNG	66

1 Kurzdarstellung / Abstract

Einleitung: Dynamische Fluoreszenz-Flowzytometrie Parameter des erweiterten Differentialblutbildes helfen bei der Differentialdiagnostik verschiedener Anämieformen, bei der Unterscheidung von Inflammation und Infektion, bei der Differenzierung zwischen bakteriellen und viralen Infekten und zur Echtzeit-Theragnostik und Steuerung einer anti-infektiven Chemotherapie beim septischen Patienten. Ebenso können diese zellulären Parameter zur Prognoseabschätzung und Mortalitätsprädiktion, sowohl beim Neugeborenen als auch bei erwachsenen Patienten, eingesetzt werden.

Methodik: Untersucht wurden Kohorten von Patienten mit verschiedenen Anämieformen im Vergleich zu „Blut-gesunden“ Patienten. Für Ret-He und Delta-He wurden Referenzbereiche der einzelnen Patientenpopulationen ermittelt und kinetische Verläufe im 9-feldrigen Hämaplot dargestellt. Des Weiteren wurden in einer klinischen Studie mit Intensivpatienten der aus mehreren zellulären Parametern bestehende ICIS-Score (Intensive Care Infection Score) erhoben und mit Proteinbiomarkern (CRP und PCT) zur infektionsmedizinischen Diagnostik und Therapiesteuerung verglichen. Abschließend wurde der prädiktive Wert von Erythroblasten-Konzentrationen bei VLBW (very low birth weight) Neugeborenen hinsichtlich Mortalität und Outcome analysiert.

Ergebnisse: Die Parameter Ret-He und Delta-He ermöglichten eine Differenzierung verschiedener Anämieformen. Die beiden Marker unterschieden sich signifikant zwischen „Blut-gesunden“ Erwachsenen und Neugeborenen, sowie zwischen Patienten mit Eisenmangelanämie (IDA), chronischer Anämie (ACD), Hämoglobinopathie/Thalassämie und waren geeignet, den Zustand vor Therapiebeginn und unter Therapie zu beschreiben. Der Hämaplot ermöglichte unter anderem das Monitoring von Parameterkinetiken von Anämiepatienten unter laufender Therapie. Durch den ICIS-Score und seine zugrunde liegenden Parameter konnte eine Unterscheidung getroffen werden zwischen Inflammation und Infektion, zwischen bakterieller und viraler Infektion und es konnte die Effektivität einer anti-infektiven Chemotherapie kontrolliert sowie die Prognose abgeschätzt werden. Eine Erythroblastenkonzentration von $> 2/nL$ stellte den besten cut-off Wert zur Mortalitätsprädiktion mit einer Sensitivität von 85% und einer Spezifität von 75% bei Neugeborenen dar.

Schlussfolgerungen: Zelluläre Marker des erweiterten Differentialblutbildes eignen sich für eine schnelle, standardisierte, rund um die Uhr verfügbare Form der Analytik zur Differentialdiagnostik von Anämien, zur Echtzeit-Theragnostik bei SIRS und Sepsis in Intensivpatienten sowie zur Prognoseabschätzung und zur Mortalitätsprädiktion bei Neugeborenen.

Abstract

Background: Dynamic fluorescence-flowcytometric parameters of the extended full blood count help with the differential diagnosis of different types of anemia, distinguish patients with and without infection, differentiate between bacterial and viral infections and particularly serve for realtime theragnostics and guidance of anti-infective chemotherapy in sepsis. Additionally, these cellular parameters can be employed for prognosis assessment and mortality prediction in newborns as well as in adult patients.

Methods: Cohorts of patients with different types of anemia as well as „blood-healthy“ newborns and adults were compared to each other. Reference values were established for Ret-He and Delta-He for the different patient populations and kinetics of those parameters were depicted in the 9-field hemaplot for single patients under therapy. In addition, the ICIS Score (Intensive Care Infection Score), consisting of a couple of cellular parameters, was tested in a clinical study and was compared to protein biomarkers (CRP und PCT) for infectious medical diagnostics and therapeutic guidance in ICU patients. Finally, the predictive value of NRBC-concentrations (erythroblasts) was determined for VLBW (very low birth weight) newborns regarding mortality and outcome.

Results: By use of the parameters Ret-He and Delta-He differentiating between different types of anemia was possible. Both markers significantly differentiated between „blood-healthy“ adults and newborns, as well as patients suffering from iron deficiency anemia (IDA) from chronic anemia (ACD), hemoglobinopathy/thalassemia and their respective states without or under therapy. The hemaplot allowed for the kinetic tracking of Ret-He and Delta-He of anemic patients under therapy. The ICIS-score and its parameters made it possible to distinguish between inflammation and infection, between bacterial and viral infection, enabled monitoring of the effectivity of an anti-infective chemotherapy as well as assessing the patient's prognosis. NRBC-concentrations of $> 2/nL$ proved to be the best cut-off value for mortality prediction with a sensitivity of 85% and a specificity of 75% in newborns.

Conclusions: Cellular markers of the extended full blood count are a form of analytics which is fast, standardized and available at a 24/7 basis for the differential diagnosis of anemia, realtime-theragnostics in patients with SIRS and sepsis as well as for prognosis assessment and mortality prediction in newborns.

2 Einführung

Die voll automatisierte zelluläre Analytik ist seit der Beschreibung des Coulter-Prinzips (Coulter 1953) unter Einsatz der hydrodynamischen Fokussierung (Thom 1969) das grundlegende Messverfahren aller Hämatologieautomaten. Moderne Systeme ergänzen diese Impedanzmessung durch optische Verfahren. Insbesondere die Fluoreszenz-Flowzytometrie (Fujimoto 1999) ermöglicht eine Differenzierung von Zellen und deren Subklassen durch die Färbung von intrazellulären Nukleinsäuren und Granula mit Quantifizierung im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (Zellgröße /Granularität) bzw. durch die Bestimmung der Seitwärtsfluoreszenz (Gehalt an Nukleinsäuren).

Zu den häufigsten Anämieformen zählt der Eisenmangel mit einer verminderten Hämoglobinisierung der Erythrozyten und ihrer Vorstufen der Retikulozyten, sowie die „anemia of chronic disease“ (ACD), die durch eine IL-6 induzierte Hepcidinproduktion hervorgerufen wird (Thomas 2011). Der Ferritin-Index Plot (auch „Thomas-Plot“ genannt) ist ein vierfeldriges Diagramm, das auf der x-Achse den Ferritin-Index (Quotient aus der Konzentration des löslichen Transferrinrezeptors dividiert durch den Logarithmus der Ferritinkonzentration) und auf der y-Achse den Hämoglobingehalt der Retikulozyten (Ret-He) darstellt (Thomas 2005). Durch die Einbeziehung der CRP-Konzentration kann der Thomas-Plot eine Akute Phase Reaktion berücksichtigen, da Ferritin bei einer Inflammation verstärkt exprimiert wird und daher der Ferritin-Index in Entzündungssituationen andere Cut-off Werte zeigt. Das Ret-He gibt die aktuelle Eisenversorgung im Erythron wieder, wohingegen der Ferritin-Index die Situation des Speichereisens reflektiert. Mit Hilfe der übersichtlichen graphischen Darstellung des Thomas-Plots können Aussagen zum Eisenstoffwechsel eines Patienten getroffen und z. B. eine EPO-Substitutionstherapie überwacht oder auch die Compliance eines Patienten unter Eisensubstitutionstherapie kontrolliert werden. Dabei können Veränderungen auf der y-Achse recht schnell erfolgen (Ret-He), eine Änderung des Ferritin-Index (x-Achse) dauert in der Regel mehrere Tage bis Wochen. Durch die Einführung des „Hepcidin-25 Plot“ (Thomas 2011) mit Darstellung der Messwerte von Ret-He auf der y-Achse und Hepcidin-25 auf der x-Achse lässt sich die Unterscheidung zwischen ACD und Eisenmangel optimieren. Durch die schnelle Reaktion des Hepcidin-25 auf die inflammatorische Situation ist dieser Plot wesentlich dynamischer

als der Thomas-Plot und für eine Echtzeit-Theragnostik geeignet. Ein großer Nachteil des Hecpidin-25 Plots stellt die für ein Routinelabor sehr aufwendige und nicht Hochdurchsatz-kompatible Nachweismethode von Hecpidin-25 mittels Massenspektrometrie dar.

Der „Hämaplot“ (Weimann 2016) stellt in einem 9-feldrigen Plot Retikulozyten-Hämoglobin (Ret-He) auf der y-Achse und Delta-Hämoglobin (Delta-He) auf der x-Achse dar. Delta-He berechnet sich aus der Differenz von Ret-He und RBC-He (Erythrozyten-Hämoglobin) der reifen, roten Erythrozyten. Beim Gesunden ist aufgrund des höheren Hämoglobingehalts der Retikulozyten der Wert immer positiv, wohingegen bei Inflammationsreaktionen mit konsekutiver Hecpidinfreisetzung mit Endozytose von Ferroportin das Delta-He negative Werte annimmt, das ist aber nicht der Fall bei Eisenmangelanämien (Weimann 2009). Der 9-feldrige Hämaplot erlaubt eine Unterscheidung von „Blut-gesunden“ Erwachsenen, „Blut-gesunden“ Neugeborenen, Thalassämien / Hämoglobinopathien, einem Vitamin B12 / Folsäure Mangelzustand, Eisenmangelanämien und ACD. Zusätzlich kann die Compliance von Patienten bei Anämietherapie mit zugrundeliegenden inflammatorischen Erkrankungen kontrolliert, oder der Hämaplot auch zur „Realtime-Theragnostik“ genutzt werden, um z.B. die Effektivität einer anti-infektiven Chemotherapie bei septischen Patienten zu überprüfen.

Als eine der häufigen Komplikationen bei Intensivpatienten kann eine Sepsis entstehen, die mit einer hohen Mortalität assoziiert ist (Engel 2007). Die Herausforderung für den Kliniker liegt dabei in der Differenzierung zwischen Inflammation und Infektion. Für diese Unterscheidung zwischen SIRS (systemic inflammatory response syndrome) und Sepsis werden in der Regel die Konzentrationen von Proteinen wie PCT oder CRP eingesetzt, die jedoch gerade in der ersten post-operativen Woche unspezifisch erhöht sind und dadurch nur eine sehr eingeschränkte Aussagekraft besitzen (Weimann 2009). Der sogenannte ICIS (Intensive Care Infection Score), der ausschließlich auf der Bestimmung der zellulären Eigenschaften aller drei Hauptreihen aus peripherem EDTA-Blut basiert, ist dagegen in der Lage, zwischen Inflammation und Infektion, sowie zwischen viraler und bakterieller Genese zu unterscheiden und die Effektivität der anti-infektiven Chemotherapie zu bestimmen (Nierhaus 2012, Weimann 2015). Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten gibt dabei Auskunft über einen bakteriellen Ursprung einer

Infektion, die Bestimmung der HFLC-Zellen (hoch fluoreszierende Lymphozyten) differenziert eine Sepsis von einem SIRS, wohingegen das Delta-He über den oben bereits beschriebenen Mechanismus der Eisensequestrierung einen Hinweis auf die Effektivität einer Antibiotikagabe zulässt. Auch ist durch die Messung der IPF (unreife Plättchenfraktion) und der NRBC (Erythroblasten) eine Prognoseabschätzung möglich (Cremer 2013, Cremer 2015). Die Einzelmessungen aus peripherem Blut werden für den ICIS bepunktet und in einem Score graphisch zusammengefasst. So kann durch die schnelle Fluoreszenz-Flowzytometrische Messung (TAT unter 1 Minute) auf einer 24 Stunden Basis an 7 Tagen in der Woche höchst kosteneffektiv ein SIRS/Sepsis-Screening durchgeführt und die Effektivität bzw. die Indikation einer Antibiotikagabe überwacht werden (Weimann 2015).

Erythroblasten (NRBC) kommen in der Regel nicht im peripheren Blut vor, da sie vor Verlassen des Knochenmarks ihren Kern ausstoßen und zunächst als unreife Retikulozyten in das periphere Blut übertreten. Durch die Kombination eines Lysereagens mit einer Färbung der Nukleinsäuren durch Fluoreszenzfarbstoffe kann ein automatisiertes Fluoreszenz-Flowzytometriegerät die Kerne der Erythroblasten nach Lyse der roten Blutzellen quantifizieren (Fujimoto 1999). Bei Konzentrationen > 200 NRBC/ μ l im peripheren Blut liegt die Mortalität von intensivmedizinischen, erwachsenen Patienten bei ca. 75% innerhalb von zwei Wochen nach Erstdetektion, wobei der Marker keinerlei Spezifität für bestimmte Krankheitsentitäten aufweist (Stachon 2004). Bei Neugeborenen mit einer intrauterinen Wachstumsrestriktion oder einer fötalen Stresssymptomatik können NRBC nachgewiesen werden, so dass hier als Auslöser für die Neuproduktion bzw. Ausschüttung von NRBC in das periphere Blut eine Hypoxie vermutet wird (Christensen 2014). Wie bei Erwachsenen ist auch bei Kindern und Neugeborenen der Nachweis von NRBC im peripheren Blut mit einer gesteigerten Mortalität und einem schlechten Outcome assoziiert (Cremer 2015). So gehen bei Neugeborenen hohe NRBC Konzentrationen z.B. mit nekrotisierender Enterocolitis, schweren intraventrikulären Blutungen, zerebralen Lähmungen oder auch dem Tod einher (Rolfo 2007, Kil 2011).

3 Methodik

3.1 Der Hämaplot zur Differentialdiagnostik und Therapieüberwachung von anämischen Patienten

Für die Proben von 345 Patienten wurden am Sysmex XN-9000 Fluoreszenz-Flowzytometriegerät (SYSMEX, Kobe, Japan) ein Blutbild (ein kleines Blutbild bzw. ein Differentialblutbild) und die Anzahl der Retikulozyten bestimmt. Der optische Retikulozytenkanal misst dabei nicht nur die Anzahl der Retikulozyten, sondern auch den Hämoglobingehalt sowohl der Retikulozyten (Ret-He) als auch der Erythrozyten (RBC-He). Die untersuchte Kohorte bestand aus einem Patientenkollektiv mit unterschiedlichen erkrankungsspezifischen Anämieformen und zwei Kontrollkohorten. Die Kontrollkohorten bestanden aus 23 „Blut-gesunden“ Neugeborenen und 30 „Blut-gesunden“ Erwachsenen. Die Gruppe der Patienten umfasste die Krankheitsentitäten einer Anämie mit chronischer Erkrankung (anemia of chronic disease = ACD), bedingt durch unterschiedliche onkologische oder chronisch-entzündliche Erkrankungen (n=138). Davon bekamen 65 Patienten eine erkrankungsspezifische Therapie, 73 Patienten waren bis zum Zeitpunkt der Messung ohne Therapie (Primärdiagnose). 18 Patienten umfasste die Kohorte mit Thalassämie und/oder Hämoglobinopathie, 35 Patienten wiesen eine Eisenmangelanämie (Eisenmangelanämie = IDA), und 17 Patienten eine Kombination aus ACD und IDA (n=17) auf. Die Gruppe der 83 Sepsispatienten gliederte sich in 32 Patienten mit Therapie und 51 ohne Therapie (Primärdiagnose). Für jede Patientengruppe wurde Ret-He, Delta-He und C-reaktives Protein (CRP) bestimmt und statistisch miteinander verglichen. Die Kinetik der Parameter Delta-He und Ret-He wurde für einzelne Patienten aus den jeweiligen Gruppen im 9-feldrigen Hämaplot dargestellt und, sofern die Messwerte vorlagen, auch mit dem Ferritinindex-Plot verglichen (Weimann 2016).

3.2 Der „Intensive Care Infection Score“ zur Differenzierung von infektiösen von nicht-infektiösen Prozessen und Therapieüberwachung bei Patienten mit SIRS und Sepsis

In dieser retrospektiven Observationsstudie wurden erwachsene Patienten verschiedener anästhesiologischer Intensivstationen der Charité Universitätsmedizin Berlin zum Vergleich verschiedener Infektionsmarker eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren Minderjährigkeit, Anbehandlung mit einer anti-infektiven Chemotherapie bereits > 12h vor Aufnahme auf eine ICU (Intensive Care Unit) und auch ein Aufenthalt < 48h auf einer ICU. Die Patienten wurden für die Studie in zwei Kohorten eingeteilt, eine Patientengruppe mit und eine ohne Infektion. Neben den stündlich erhobenen klinisch-intensivmedizinischen Messgrößen wurden SAPS II, SOFA, APACHE und TISS Scores täglich erhoben und dreimal täglich aus peripherem Blut für Labordiagnostik zur SIRS-/Sepsisdiagnostik bestimmt. CRP und PCT wurden einmal täglich und ein Differentialblutbild mit Retikulozytenbestimmung auf einem SYSMEX Fluoreszenz-Flowzytometriegerät XE-5000 (SYSMEX, Kobe, Japan) zur Berechnung des ICIS-Score dreimal täglich gemessen. Als Goldstandard für den Nachweis einer Infektion diente der positive bakteriologische Nachweis aus Blutkulturen, Trachealsekret oder Abstrichen, sowie positive Nachweise eines Infektes durch Röntgenbilder der Lunge.

Für die Gesamtheit der ICU-Patientengruppe und einer Subgruppe an postoperativen Patienten wurden PCT, CRP und ABP (actual best practice) mit dem ICIS-Score verglichen, um die existierenden Methoden zur Sepsisdiagnostik miteinander in Relation zu setzen. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit des ABX-Monitoring (ABX = Antibiotikagabe) mittels ICIS untersucht (Weimann 2015).

3.3 Erythroblasten im peripheren Blut als Mortalitätsprädiktor bei Neugeborenen

In dieser Studie wurden die Daten von 438 VLBW (very low birth weight) Neugeborenen mit einem Gestationsalter < 32 SSW eingeschlossen, die im Zeitraum 6/2006 – 12/2010 auf einer NICU (neonatal intensive care unit) der Charité Universitätsmedizin Berlin aufgenommen wurden. Ausschlusskriterien waren fehlende Blutbildanalysen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme oder zwischen Tag zwei und fünf nach Aufnahme. Überleben wurde definiert als Verlegung auf eine andere Station oder in ein anderes Krankenhaus. Eines schlechtes Outcome lag vor, wenn eine der folgenden Konditionen zutraf: schwere intraventrikuläre Blutung, late-onset klinische Sepsis, Laserbehandlung einer Retinopathie, chirurgische Ligation eines offenen Ductus arteriosus, bronchopulmonale Dysplasie, zystische periventrikuläre Leukomalazie oder jedwede Form einer dringlichen Laparotomie und Tod.

Blutbildbestimmungen wurden auf einem SYSMEX Fluoreszenz-Flowzytometriergerät XE-2100 (SYSMEX, Kobe, Japan) durchgeführt mit der Bestimmung von NRBC (nucleated red blood cells). Wurden mehrere Messungen in der ersten Periode <24h nach Aufnahme, bzw. zwischen den Tagen zwei bis fünf nach Aufnahme auf die NICU durchgeführt, so wurde der Mittelwert der NRBC-Konzentrationen für die statistische Betrachtung herangezogen. Patienten < 3. Perzentile wurden als SGA (small for gestational age) gewertet. Perinatalparameter, Morbiditäten und die NRBC-Konzentration wurden zwischen den Kohorten der überlebenden und verstorbenen VLBW verglichen und ROC-Kurven für den prädiktiven Wert für Mortalität der Erythroblastenkonzentration mit dem Geburtsgewicht berechnet (Cremer 2015).

4 Ergebnisse

4.1 Der Hämaplot zur Differentialdiagnostik und Therapieüberwachung von anämischen Patienten

Die Parameter Delta-He und Ret-He können zur Differentialdiagnose unterschiedlicher Anämiearten eingesetzt werden. So ergeben sich signifikante Unterschiede bei der Bestimmung von Delta-He zwischen den Gruppen der „Blut-gesunden“ Neugeborenen und „Blut-gesunden“ Erwachsenen ($p < 0.05$), und auch die Gruppe der IDA-Patienten kann von den ACD- und ACD/IDA-Patienten unterschieden werden ($p < 0.05$). Ist eine Identifizierung von Thalassämie- / Hämoglobinopathiepatienten durch die Bestimmung von Ret-He allein nicht möglich, so kann diese erfolgreich durch die zusätzliche Messung von Delta-He vorgenommen werden. Darüber hinaus zeigen Ret-He und Delta-He signifikante Unterschiede bei den einzelnen Kohorten mit und ohne Therapie (Sepsis, ACD, ACD/IDA, $p < 0.05$, Abbildung 1).

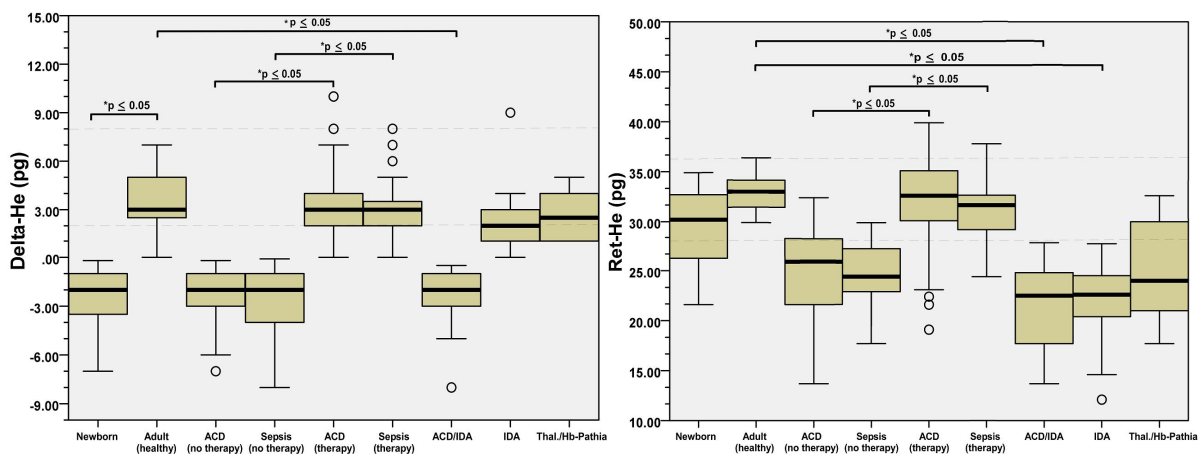


Abbildung 1: Box und Whisker Plots für Delta-He Werte (links) und Ret-He Werte (rechts). Die gepunktete Linien geben die Referenzbereiche wieder (+2 bis +8 pg für Delta-He und 28 bis 36 pg für Ret-He). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit $p \leq 0.05$ gekennzeichnet (nach Weimann et al. 2016).

Der Hämaplot ermöglicht aufgrund seiner graphischen Darstellung eine schnelle Orientierung über eine mögliche Anämie-Differentialdiagnose, das Therapiemonitoring und die Kontrolle der Patienten-Compliance (Abbildung 2).

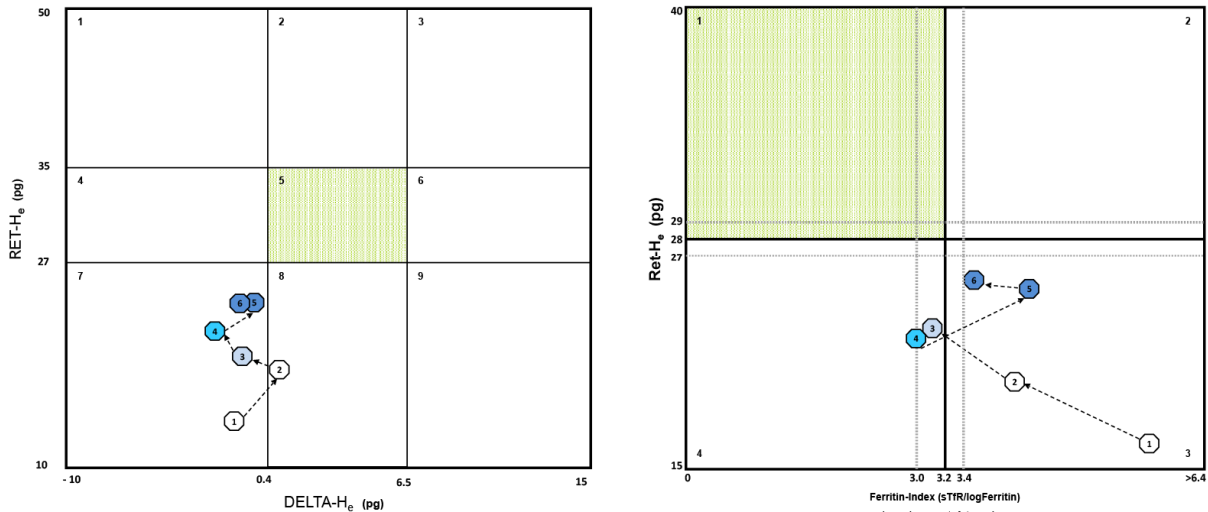


Abbildung 2: Hämplot links und Ferritin-Index Plot rechts einer 18 jährigen M. Crohn Patientin mit Nicht-Compliance. Die Messungen beginnen im Hämplot (links) an Tag 1 in Quadrant 7 mit negativen Delta-He Werten (Erstdiagnose) und verbleiben im selben Quadranten über 145 Tage (Punkt 6 in Quadrant 7). Analog sind die Messwerte im Ferritin-Index Plot (rechts) von Tag 1 im Quadranten 3 für 145 Tage lokalisiert (keine Auffüllung der Eisenspeicher, nach Weimann et al. 2016).

4.2 Der „Intensive Care Infection Score“ zur Differenzierung von infektiösen von nicht-infektiösen Prozessen und Therapieüberwachung bei Patienten mit SIRS und Sepsis

Im Rahmen dieser Studie wurden bei 172 Intensivpatienten (davon 72 post-operativ) der neu etablierte zelluläre ICIS-Score (Intensive Care Infections Score) mit konventionellen Proteinbiomarkern (CRP, PCT) zur Sepsisdiagnostik und Therapiemonitoring verglichen. Ein cutoff-Wert des ICIS von 3 hatte den höchsten prädiktiven Wert mit einer Sensitivität von 82,9% bzw. einer Spezifität von 75,1% bei post-operativen Patienten zur Vorhersage einer Infektion. Der ICIS war CRP und PCT deutlich überlegen, sowohl bei den Raten der falsch-negativen Antibiotikagabe bei septischen Patienten, als auch bei den Raten der falsch-positiven Antibiotikagaben bei Patienten ohne Infektion (Tabelle 1).

Sepsis		Abx treatment yes	Abx treatment no	False neg Abx %
Act. best practice	95	78	17	17,9
PCT algorithm	95	39	56	58,9
PCT best cut-off	95	59	36	37,9
CRP best cut-off	95	68	27	28,4
ICIS best cut-off	95	73	22	23,2
ICIS monitoring	95	85	10	10,5

No Infect	Total	Abx treatment no	Abx treatment yes	False pos Abx %
Act. best practice	142	87	55	38,7
PCT algorithm	142	104	38	26,8
PCT best cut-off	142	88	54	38,0
CRP best cut-off	142	87	55	38,7
ICIS best cut-off	142	126	16	11,3
ICIS monitoring	142	122	20	14,1
SIRS		Abx treatment no	Abx treatment yes	False pos Abx %
Act. best practice	105	47	58	55,2
PCT algorithm	105	77	28	26,7
PCT best cut-off	105	57	48	45,7
CRP best cut-off	105	43	62	59,0
ICIS best cut-off	105	91	14	13,3
ICIS monitoring	105	78	27	25,7

Tabelle 1: Retrospektiver Vergleich der täglichen ABX-Therapieentscheidungen für 72 postoperative Patienten (n total samples = 385) innerhalb der ersten 7 Tage auf der Intensivstation. „total“, Anzahl an Patienten in Kohorte; „Abx treatment yes/no“, Gabe bzw. keine Gabe an Antibiotika; „False neg / False pos Abx%“, falsch-negative bzw. falsch-positive Gabe an Antibiotika im Vergleich zum Ergebnis der mikrobiologischen Analytik (nach Weimann et al. 2015).

4.3 Erythroblasten im peripheren Blut als Mortalitätsprädiktor bei Neugeborenen

In dieser Studie wurden die Daten von 438 Kindern, die auf NICUs verlegt worden waren, mit einem Gestationsalter <32 Wochen und einem Geburtsgewicht < 1500 g über eine Studienperiode von fünf Jahren ausgewertet. Von ihnen verstarben 46 Patienten und 65 erkrankten schwer. Nicht-Überlebende wiesen signifikant höhere NRBC-Konzentrationen im Vergleich zu den Überlebenden zwischen dem zweiten und fünften Tag nach Aufnahme auf eine NICU auf. Diese Beobachtung traf sowohl für Patienten zu, die für das Gestationsalter zu klein waren (SGA), als auch für eutrophe Neugeborene (AGA). Ein Anstieg von 10/nL der mittleren Erythroblastenkonzentrationen am postnatalen Tag 2 bis 5 ging mit einer Odds Ratio für Mortalität von 6.95 (95% CI 2.21–21.86) und einer Odds Ratio für das verbundene Outcome von Mortalität und schwerer Morbidität von 3.43 (95% CI 1.43–8.24) einher. Der beste cut-off Wert zur Mortalitätsprädiktion war eine NRBC-Konzentration von 2/nL mit einer Sensitivität von 85% und einer Spezifität von 75%.

5 Diskussion

In der labormedizinischen Routinediagnostik hat die Bestimmung des Blutbildes, neben klassischen klinisch-chemischen Parametern, den größten Anteil an der angeforderten Analytik und wird zur Differentialdiagnostik von Anämien, Thrombozytopenien, den Nachweis inflammatorischer und septischer Zustände und auch zum Screening nach Lymphomen und Leukämien herangezogen (Weimann 2009, Weimann 2011). Durch den Einsatz der Fluoreszenz-Flowzytometrie mit hydrodynamischer Fokussierung können aus ca. 150 Mikroliter EDTA-Vollblut fast 80 unterschiedliche Parameter innerhalb einer Messzeit von etwa einer Minute bestimmt werden. Durch die hohe Stabilität der Parameter bis zu 72 Stunden (Imeri 2008) einschließlich einem „rund um die Uhr“ verfügbaren hochautomatisierten analytischen Prozesses ohne präanalytische Vorbereitung hat sich das erweiterte Differentialblutbild als eine preisgünstige, gut standardisierte, quantitative und weitgehend objektivierbare Methode in den allermeisten Krankenhauslaboren etabliert (Weimann 2011).

Im Gegensatz zu Messgrößen wie MCH oder MCV des roten Blutbildes, die erst nach vielen Tagen bzw. Wochen auf therapeutische Interventionen ansprechen, sind Ret-He und Delta-He quantitative Echtzeit-Parameter, die bereits nach wenigen Stunden mit Veränderungen reagieren (Weimann 2015). Mit Hilfe der Bestimmung dieser beiden Parameter ist nicht nur eine Abgrenzung verschiedener Anämieformen voneinander möglich, sondern lässt sich insbesondere das therapeutische Monitoring von Eisensubstitutionstherapien, Substitution bei Vitamin B12-Mangel oder eine anti-inflammatorische Therapie übersichtlich erfassen (Weimann 2016). Die direkte Bestimmung von Hcpidin-25 mittels Massenspektrometrie im Gegensatz zur Bestimmung des Hämoglobinisierungsgrades von Retikulozyten (Ret-He) ist aktuell noch zu zeitaufwändig und kostenintensiv. Die zur Verfügung stehenden Immunoassays sind zudem noch nicht ausreichend für den Routineeinsatz standardisiert (Thomas 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Einsatz von Delta-He signifikant zwischen Patientengruppen mit ACD oder Sepsis vor und unter einer medikamentösen Therapie sowie die Patientengruppe mit ACD/IDA von „Blut-gesunden“ Erwachsenen bzw. Patienten mit einer reinen Eisenmangelanämie (IDA) unterschieden werden. Eine Unterscheidung von „Blut-gesunden“ Erwachsenen und Patienten mit IDA war nicht allein durch die Bestimmung der Delta-He

Konzentration möglich, sondern nur durch die Mitbestimmung von Ret-He. Die alleinige Bestimmung von Ret-He war jedoch nicht in der Lage, zwischen ACD und ACD/IDA zu differenzieren. Ergänzend zum Ferritin-Index Plot zur Analyse des Eisenspeicherstatus bietet der Hämplot aufgrund der deutlich höheren Dynamik seiner Parameter eine gute Ergänzung und zusätzliche Informationen insbesondere für die Echtzeit-Theragnostik und Überprüfung der Patienten-Compliance (Weimann 2016).

Eine Konzentrationsänderung des Delta-He mit steigenden Werten zeigt sich beim septischen Patienten unter einer adäquaten anti-infektiven Chemotherapie innerhalb weniger Stunden und signalisiert damit eine schwächer werdende Entzündungsreaktion (Weimann 2015). In der vorliegenden Studie war das Delta-He Teil des Multiparameter-ICIS-Scores (Abbildung 3). Der ICIS hilft bei der Unterscheidung von Inflammation und Infektion (Neutrophilenkonzentration, Konzentration der unreifen Granulozyten (IG) und hoch-fluoreszierenden Lymphozyten (HFLC)), zur Differenzierung viraler von bakteriellen Infekten (Aktivierungsgrad der Neutrophilen (NEUT-y)), bei der Überprüfung der Effektivität einer anti-infektiven Chemotherapie (Delta-He) und dient der Prognoseabschätzung (unreife Retikulozytenfraktion (IRF), Thrombozytenkonzentration (PLT) und Konzentration der unreifen Plättchen (IPF), Nierhaus 2012). Im Vergleich zu den Proteinbiomarkern PCT und CRP war der ICIS insbesondere zur frühen Unterscheidung von SIRS und Sepsis innerhalb der ersten 5 Tage deutlich überlegen. Durch den Einsatz des ICIS mit seinem schnelleren und spezifischeren Ansprechen der multiplen zellulären Parameter gegenüber den Proteinbiomarkern hätte in der post-operativen Gruppe eine unnötige anti-infektive Chemotherapie (Rate der falsch-positiven ABX) bei Patienten ohne Infektion vermindert, als auch die Rate der falsch-negativen ABX bei septischen Patienten reduziert werden können. Eine Optimierung der ABX-Regime bei Intensivpatienten und Reduzierung der UAW (unerwünschte Arzneimittelwirkungen) durch Antibiotika scheint so möglich (Weimann 2015).

	05.03.2011 11:08:41	06.03.2011 8:41:42	07.03.2011 9:42:13	08.03.2011 7:54:42	09.03.2011 7:20:39	10.03.2011 6:20:15	10.03.2011 2:14:33	10.03.2011 9:49:57	11.03.2011 8:19:39
HFLC	150	200	140	170	170	120	100	70	50
IG#	280	1510	1460	600	480	370	360	280	220
NEUT-Y	717	715	590	549	505	491	484	462	457
Delta He	-3,2	-2,7	-5,2	-4,1	2,7	8,6	8,8	9,4	10,4
NEUT#	9100	25570	25330	20230	20000	19940	18790	17080	14800
PLT	214	62	61	60	69	73	85	93	97
IPF#	94000	45000	37000	70000	77000	100000	94000	113000	131000
NRBC#	220	490	530	170	50	0	30	0	0
IRF#	12200	34500	34000	33600	35000	40500	32900	23500	27900
ICIS	13	17	18	14	10	7	7	5	5

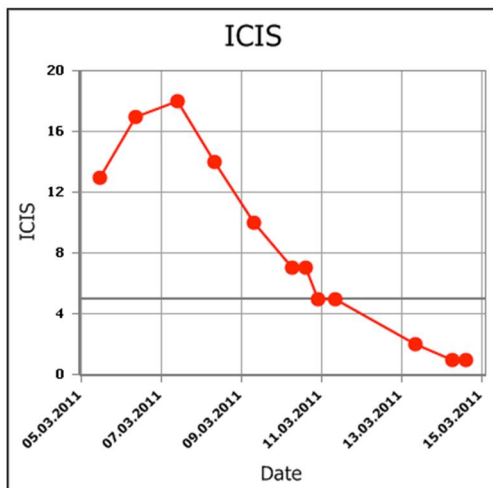


Abbildung 3: Exemplarische tabellarische und graphische Darstellung des ICIS-Scores eines ICU-Patienten mit Angabe der Parameter, auf denen der ICIS-Score basiert, im zeitlichen Verlauf; „HFLC“, hochfluoreszierende Lymphozyten, „IG#“, Konzentration an unreifen Granulozyten, „NEUT-Y“, Aktivierungsgrad von Neutrophilen, „Delta-He“, Delta-Hämoglobin, „NEUT#“, Neutrophilenkonzentration, „PLT“, Thrombozytenkonzentration, „IPF#“, Konzentration an unreifen Plättchen, „NRBC#“, Erythroblastenkonzentration, „IRF#“, Konzentration an unreifen Retikulozyten.

Die Bestimmung der Erythroblastenkonzentration ermöglicht eine Aussage über die Prognose eines Patienten und ist wahrscheinlich ein Maß einer zentralen Hypoxie (Stachon 2006). Übereinstimmend mit der Literatur (Rolfo 2007, Kil 2011) konnte in der vorliegenden Studie eine Assoziation zwischen Geburtsgewicht und Erythroblastenkonzentration gezeigt werden (Cremer 2015). Ein automatisiert bestimmter NRBC-Wert mit einem cut-off von 2 NRBC/nL war mit einer Sensitivität von 83% für die Mortalitätsprädiktion assoziiert, was gut mit den mikroskopischen Daten von Bashat et al. (Bashat 2007) übereinstimmt. Reflektiert der initiale Nachweis von NRBC unmittelbar nach der Geburt die Sauerstoff-Versorgungssituation *in utero*, so ist deren Konzentrationsanstieg bei Bestimmung zwischen dem zweiten und fünften Lebenstag mit einem schlechteren Outcome korreliert. Ob ein NRBC-Anstieg im peripheren Blut auf eine gesteigerte EPO-Produktion oder auch eine weniger effiziente Enukleation der Normoblasten in der fötalen Leber bei SGA-Neugeborenen zurückzuführen ist, muss in weiteren Studien noch geklärt werden (Cremer 2015).

6 Abkürzungsverzeichnis

ABP	actual best practice
ABX	Antibiotikagabe
ACD	anemia of chronic disease
AGA	adaequate for gestional age
CRP	C-reaktives Protein
d	day
Delta-He	Delta-Hämoglobin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
HFLC	high fluorescent lymphocytes
ICIS	Intensive Care Infection Score
ICU	Intensive Care Unit
IG	immature granulocytes
IPF%	relative immature platelet fraction
IPF#	absolute number of immature platelets
IRF	immature reticulocyte fraction
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
NEUT-X	Seitwärts-Streulicht der neutrophilen Granulozyten
NEUT-Y	Seitwärts-Fluoreszenz Streulicht der neutrophilen Granulozyten
NICU	neonatalogical intensive care unit
nL	Nanoliter
NRBC	nucleated red blood cell, Erythroblast
p	probability
PCT	Procalcitonin
RBC-He	Erythrozyten-Hämoglobin
Ret-He	Retikulozyten-Hämoglobin
SGA	small for gestational age
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SSW	Schwangerschaftswoche
TAT	turnaround time
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung

VLBW	very low birth weight
WAM	workarea manager
XE-2100	Blutbild-Analysegerät der Firma SYSMEX, Kobe, Japan
XE-5000	Blutbild-Analysegerät der Firma SYSMEX, Kobe, Japan
XE-9000	Blutbild-Analysegerät der Firma SYSMEX, Kobe, Japan

7 Literaturverzeichnis

- Baschat AA., Gungor S., Kush ML., Berg C., Gembruch U., Harman CR. (2007), „Nucleated red blood cell counts in the first week of life: a critical appraisal of relationships with perinatal outcome in preterm growth-restricted neonates“, *Am J Obstet Gynecol*, 197, 286–8
- Christensen RD., Lambert DK., Richards DS. (2014), „Estimating the nucleated red blood cell ‘emergence time’ in neonates“, *J Perinatol*, 34, 116–9
- Coulter WH. (1953), „Means for counting particles suspended in a fluid“, U.S.P. Office No. 2656506
- Cremer M., Weimann A., Szekessy D., Hammer H., Bühner C., Dame C. (2013), „Low immature platelet fraction suggests decreased megakaryopoiesis in neonates with sepsis or necrotizing enterocolitis“, *J Perinatol*, 33, 622-6
- Cremer M., Roll S., Gräf C., Weimann A., Bühner C., Dame C. (2015), „Nucleated red blood cells as marker for an increased risk of unfavorable outcome and mortality in very low birth weight infants“, *Early Hum Dev*, 91, 559-63
- Engel C., Brunkhorst FM., Bone HG., Brunkhorst R., Gerlach H., Grond S., Gruendling M., Huhle G., Jaschinski U., John S. (2007), „Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study“, *Intensive Care Med*, 33, 606-618
- Fujimoto K. (1999), „Principles of Measurement in Hematology Analyzers Manufactured by Sysmex Corporation“, *Sysmex J Int*, 9, 31-44
- Imeri F., Herklotz R., Risch L., Arbetsleitner C., Zerlauth M., Risch GM., Huber AR. (2008), „Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: a stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100“, *Clin Chim Acta*, 397, 68-71
- Kil TH., Han JY., Kim JB., Ko GO., Lee YH., Kim KY. (2011), „A study on the measurement of the nucleated red blood cell (nRBC) count based on birth weight and its correlation with perinatal prognosis in infants with very low birth weights“, *Korean J Pediatr*, 54, 69–78
- Nierhaus A., Linssen J., Wichmann D., Braune S., Kluge S. (2012), „Use of a weighted, automated analysis of the differential blood count to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammation: the intensive care infection score (ICIS)“, *Inflamm Allergy Drug Targets*, 11, 109-15
- Rolfo A., Maconi M., Cardaropoli S., Biolcati M., Danise P., Todros T. (2007), „Nucleated red blood cells in term fetuses: reference values using an automated analyzer“, *Neonatology*, 92, 205–8
- Stachon A., Holland-Letz T., Krieg M. (2004), „High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood.“, *Clin Chem Lab Med*, 42, 933-8

Stachon A., Kempf R., Holland-Letz T., Friese J., Becker A., Krieg M. (2006), „Daily monitoring of nucleated red blood cells in the blood of surgical intensive care patients", Clin Chim Acta, 366, 329–335

Thom R., Hampe A., Sauerbrey G. (1969), „Die elektronische Volumenbestimmung von Blutkörperchen und ihre Fehlerquellen" Z. Gesamte Exp Med, 151, 331-349

Thomas C., Thomas L. (2005), "Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis", Lab Hematol., 11, 14-23

Thomas C., Kobold U., Balan S., Roeddiger R., Thomas L. (2011), „Serum hepcidin-25 may replace the ferritin index in the Thomas plot in assessing iron status in anemic patients.“ Int J Lab Hem, 33, 187-193

Weimann A., Weimann K., Lun A. (2009), „Hämatologische Veränderungen in der Intensivmedizin - Das erweiterte Blutbild", AINS, 44, 164-170

Weimann A. (2011), „Neue dynamische Fluoreszenz-Flowzytometrie Parameter des erweiterten Blutbildes“, Habilitation Charité Universitätsmedizin Berlin, http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000037313

Weimann K., Zimmermann M, Spies C., Wernecke K., Vicherek O., Nachtigall I., Tafelski S., Weimann A. (2015), „Intensive Care Infection Score - A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients“, J Int Med Res, 43, 435-51

Weimann A., Cremer M., Hernaiz-Driever P., Zimmermann M. (2016), „Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia“, Clin Lab, 62, 667-677

8 Anteilserklärung mit eidesstattlicher Versicherung

„Ich, PD Dr. med. Dipl. biochem. Andreas Weimann, MHBA, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einsatz dynamischer Fluoreszenz-Flowzytometrie-Parameter zur Diagnostik von Anämien und Sepsis sowie zur Mortalitätsprädiktion“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

PD Dr. med. Dipl. biochem. Andreas Weimann, MHBA hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Weimann A., Cremer M., Hernaiz-Driever P., Zimmermann M. (2016), „Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia“, Clin Lab, 62, 667-677

Beitrag im Einzelnen:

Literaturrecherche, teilweise Messung der Proben, Mitwirkung bei der Datenanalyse und Interpretation der Ergebnisse, Verfassen des Manuskripts, Mitwirkung bei der Erstellung von Abbildungen, Mitwirkung beim Design des Hämaplots im EXPERTviewer

Publikation 2:

Weimann K., Zimmermann M, Spies C., Wernecke K., Vicherek O., Nachtigall I., Tafelski S., Weimann A. (2015), „Intensive Care Infection Score - A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients“, J Int Med Res, 43, 435-51

Beitrag im Einzelnen:

Literaturrecherche, Mitwirkung beim Studiendesign, Mitwirkung bei der Interpretation der Ergebnisse, Mitwirkung bei der Erstellung von Abbildungen, anteiliges Verfassen des Manuskripts und kritische Überarbeitung des Textes, Mitwirkung bei der Etablierung des ICIS im EXPERTviewer

Publikation 3:

M. Cremer, S. Roll, C Gräf, A. Weimann, C. Bühner and C. Dame, „Nucleated red blood cells as marker for an increased risk of unfavorable outcome and mortality in very low birth weight infants“, Early Hum Dev, 2015, 91, 559-63

Beitrag im Einzelnen:

Mitwirkung bei der Literaturrecherche, Mitwirkung beim Studiendesign, Mitwirkung bei der Interpretation der Ergebnisse, Mitwirkung bei der Erstellung von Abbildungen, kritische Überarbeitung des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

PD Dr. med. Dipl. biochem. Andreas Weimann, MHBA

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

PD Dr. med. Dipl. biochem. Andreas Weimann, MHBA

9 Ausgewählte Publikationen

9.1 Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia

Weimann A., Cremer M., Hernaiz-Driever P., Zimmermann M. (2016), „Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia“, Clin Lab, 62, 667-677

DOI <http://dx.doi.org/10.7754/Clin.Lab.2015.150830>

9.2 Intensive Care Infection Score - A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients

Weimann K., Zimmermann M, Spies C., Wernecke K., Vicherek O., Nachtigall I., Tafelski S., Weimann A. (2015), „Intensive Care Infection Score - A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients“, J Int Med Res, 43, 435-51

DOI <http://dx.doi.org/10.1177/0300060514557711>

9.3 Nucleated red blood cells as marker for an increased risk of unfavorable outcome and mortality in very low birth weight infants

Cremer M., Roll S., Gräf C., Weimann A., Bühner C., Dame C. (2015), „Nucleated red blood cells as marker for an increased risk of unfavorable outcome and mortality in very low birth weight infants“, Early Hum Dev, 91, 559-63

DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.06.004>

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Komplette Publikationsliste

Publikationen (Gesamt IF 100,978)

Erstautor, Co-Erstautor, Co-Letztautor, Letztautor (IF kumuliert 36,088)

M. Zimmermann, M. Cremer, P. Hernaiz-Driever and **A. Weimann**, "Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia", Clin Lab, 2016, **62**, 667-677 (**IF 1.129**)

K. Weimann, M. Zimmermann, CD. Spies, KD. Wernecke, O. Vicherek, I. Nachtigall, S. Tafelski and **A. Weimann**, „Intensive Care Infection Score--A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients“, J Int Med Res, 2015, **43**,435-51 (**IF 1.438**)

M. Zimmermann, P. Steenhuis J. Linssen and **A. Weimann**, "Detection and quantification of hypo- and hypergranulated neutrophils on the new Sysmex XN hematology analyzer: establishment of an adapted reference interval for the neutrophil-granularity-intensity compared to XE-technology in adult patients“, Clin Lab, 2015, **61**, 235-41 (**IF 1.129**)

M. Zimmermann, K. Ruprecht, F. Kainzinger, F. L. Heppner and **A. Weimann**, "Automated versus manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber", IJLH, 2011, **33**, 629-637 (**IF 1.819**)

M. Zimmermann, M. Cremer, C. Hoffmann, K. Weimann, and **A. Weimann**, "Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases", CCLM, 2011, **49**, 1193-1198 (**IF 2.707**)

A. Weimann, A. Rieger, M. Zimmermann, M. Gross, P. Hoffmann, H. Slevogt and L. Morawietz, "Comparison of six immunohistochemical markers for the histologic diagnosis of neoplasia in Barrett's esophagus.", Virchows Archiv, 2010, **457**, 537-545 (**IF 2.651**)

A. Weimann, M. Zimmermann, M. Gross, H. Slevogt and L. Morawietz, "CDX2 and Li-Cadherin expression in esophageal mucosa: Use of both markers can facilitate the histologic diagnosis of "Barrett's esophagus and carcinoma", International Journal of Surgical Pathology, 2010, **18**, 330-337 (**IF 1,134**)

M. Cremer*, **A. Weimann***, G. Schmalisch, H. Hammer, C. Bühner and C. Dame, "Immature platelet fraction reflects megakaryopoietic activity in neonatal early-onset thrombocytopenia", ***co-first authors**, Thrombosis Haemostasis, 2010, **103**, 1016-1021 (**IF 4.984**)

C. Hoffmann, P. Hoffmann, A. Lun, C. Büning, F. Hiepe, HU. Scherer, E. Steinhagen-Thiessen, **A. Weimann**, „Is there a role for mannan-binding lectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease?“, Immunogenetics, 2010; **62**, 231-5 (**IF 2.942**)

A. Weimann, A. Lun, S. Lun, M. Zimmermann, AC. Borges, R. Ziebig, JB. Gonzalez, S. Gilka, M. Saravia, F. Knebel, S. Schroeckh, I. Schimke, „Leukocyte, neutrophil, immature granulocyte counts and interleukin-6 are superior to procalcitonin, C-reactive protein and Delta-He for detection of mild inflammation: data from marathon runners producing mild systemic inflammation visible immediately after the run“, J Lab Med, 2010, **34**, 53-59 (**IF 0.233**)

C. Schlaak, P. Hoffmann and **A. Weimann**. "Choice of plasmid preparation kit influences sequencing results.", *Biotechnol. Letters*, 2010; **32**(3), 421-2 (**IF 1.768**)

M. Cremer, J. Paetzold, G. Schmalisch, H. Hammer, A. Loui, C. Dame and **A. Weimann**. "Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia", *Br J Haematol.*, 2009, **144**, 619-621 (**IF 4.971**)

A. Weimann, RM. Eisele, S. Pawellek, M. Hippler-Benscheid, A. Rüggeberg, H. Cammann, C. Radke, C. Müller, J. Klupp and A. Lun. "Diagnostic value of peripheral blood markers for acute rejection in LTx-patients receiving anti IL-2R antibodies", *J Lab Med*, 2008, **32**, 148-157 (**IF 0.233**)

L. Morawietz*, **A. Weimann***, JH.Schroeder, RJ Kuban, U. Ungethuen, C. Kaps, H. Slevogt, MG. Krukemeyer and V. Krenn, "Gene Expression in Endoprosthesis Loosening - Chitinase Activity for Early Diagnosis?", *Journal of Orthopedic Research*, 2008, **26**, 394-403 ***co-first authors (IF 2.986)**

A. Weimann, S. Lun, C. Müller, J. Pratschke, P. Reinke and A. Lun. "Reticulocytes and their immature fraction do not detect acute rejection after kidney transplantation", *Transplantation Proceedings*, 2007, **39**, 514-17 (**IF 1.055**)

B. Neukamm*, **A. Weimann***, S. Wu, M. Danevad, C. Lang and R. Gessner. "Novel two-stage screening procedure leads to the identification of a new class of transfection enhancers", *J. Gene Med.*, 2006, **8**, 745-53. ***co-first authors (IF 3.141)**

C. Schlaak, P. Hoffmann and **A. Weimann**. "Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in E.coli: a comparison of different physical methods", *Biotechnol. Letters*, 2005, **27**, 1003-1005 (**IF 1.768**)

Co-Autorenschaft (kumulierter IF 54,261)

M. Cremer, S. Roll, C Gräf, **A. Weimann**, C. Bühner and C. Dame, „Nucleated red blood cells as marker for an increased risk of unfavorable outcome and mortality in very low birth weight infants“, *Early Hum Dev*, 2015, **91**, 559-63 (**IF 1,875**)

BB. Singer, L. Opp, A. Heinrich, F. Schreiber, R. Binding-Liermann, LC. Berrocal-Almanza, KA. Heyl, MM. Müller, **A. Weimann**, J. Zweigner and Slevogt H, "Soluble CEACAM8 Interacts with CEACAM1 Inhibiting TLR2-Triggered Immune Responses“, *PLoS One*. 2014, **17**, e94106 (**IF 4.250**)

I. Nachtigall, A. Tamarkin, S. Tafelski, **A. Weimann**, A. Rothbart, S. Heim, K. Wernecke and C. Spies, "Polymorphisms of the toll-like receptor 2 and 4 genes are associated with faster progression and a more severe course of sepsis in critically- ill patients", *J. of Int. Med. Res.* 2014, **42**, 93-110 (**IF 1.438**)

M. Cremer, **A. Weimann**, D. Szekessy, H. Hammer, C. Bühner and C. Dame, „Low immature platelet fraction suggests decreased megakaryopoiesis in neonates with sepsis or necrotizing enterocolitis“, *J Perinatol.*, 2013, **33**, 622-6 (**IF 2.248**)

M. Schmidt-Hieber, R. Dabrowski, **A. Weimann**, B. Aicher, C. Loddenkemper, P. Lohneis, A. Busse, A. Stroux, E. Thiel and I.W. Blau, "In vitro cytotoxicity of the novel anti-myeloma agents perifosine, bortezomib and lenalidomide against different cell lines", *Invest New Drugs*, 2012, **30**, 480-9 (**IF 3.072**)

E. Frisch, M. Kaup, K. Egerer, **A. Weimann**, R. Tauber, M. Berger and V. Blanchard, "Profiling of Endo H-released serum N-glycans using CE-LIF and MALDI-TOF-MS - Application to rheumatoid arthritis", *Electrophoresis*, 2011, **32**, 3510-5 (**IF 3.569**)

G. Strauß, C. Vollert, A. von Stackelberg, B. Schütz, **A. Weimann**, G. Gaedicke and H. Schulze, "Immature platelet count: A simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia", *Pediatric Blood & Cancer*, 2011, **57**, 641-647 (**IF 2.386**)

SGM. Saravia, F. Knebel, S. Schroeckh, R. Ziebig, A. Lun, **A. Weimann**, A. Haberland, AC. Borges and I. Schimke, "Cardiac Troponin T Release and Inflammation Demonstrated in Marathon Runners", *Clin. Lab.*, 2010, **56**, 51-58 (**IF 1.129**)

DA. Jacob, M. Bahra, SC. Schmidt, G. Schumacher, **A. Weimann**, P. Neuhaus and UP. Neumann. "Mayo risk score for primary biliary cirrhosis: A useful tool for the prediction of course after liver transplantation?", *Ann Transplant.*, 2008, **13**, 35-42 (**IF 1.261**)

M. Schmidt-Hieber, T. Burmeister, **A. Weimann**, D. Nagorsen, WK. Hofmann, E. Thiel, S. Schwartz. "Combined automated cell and flow cytometric analysis enables recognition of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL), a study of 25 patients", *Ann Hematol.*, 2008, **87**, 829-36 (**IF 2.688**)

Y. Robinson, A. Matenov, S. Tschoeke, **A. Weimann**, A. Oberholzer, W. Ertel and A. Hostmann. "Impaired erythropoiesis after haemorrhagic shock in mice is associated with erythroid progenitor apoptosis in vivo", *Acta Anaesthesiol Scand.*, 2008, **52**, 605-13 (**IF 2.322**)

H. Slevogt, L. Maqami, K. Vardowa, W. Beermann, A. Hocke, **A. Weimann**, J. Eitel, B. Opitz, S. Hippenstiel, N. Suttorp and P. Dje N'Guessan. "Moraxella catarrhalis-induced IL-8 response in pulmonary epithelium is mediated by UspA2 dependent Proteinkinase C activation and is differentially regulated by PKC isoforms", *European Respiratory Journal*, 2008, **31**, 725-35 (**IF 7.636**)

A. Bukovsky, **A. Weimann**, MA. Accola and H. Gottlinger. "Transfer of the HIV-1 cyclophilin-binding site to simian immunodeficiency virus from macaca mulatta can confer both cyclosporin sensitivity and cyclosporin dependence", *PNAS*, 1997, **94**, 10943-10948 (**IF 9.771**)

T. Dorfman, **A. Weimann**, A. Borsetti, CT. Walsh and H. Gottlinger. "Active-site residues of cyclophilin A are crucial for its incorporation into human immunodeficiency virus type 1 virions", *J. Virol.*, 1997, **71**, 7110-7113 (**IF 5.308**)

A. Bukovsky, T. Dorfman, **A. Weimann**, and H. Gottlinger. "Nef Association with Human Immuno-deficiency Virus Type 1 Virions and Cleavage by the Viral Protease", *J. Virol.*, 1997, **71**, 1013-1018 (**IF 5.308**)

Fallberichte (kumulierter IF 10,343)

LM. Graul-Neumann, A. Bach, M. Albani, H. Ringe, **A. Weimann**, W. Kress, O. Hiort and O. Bartsch, "Boy With Pseudohypoparathyroidism Type 1a Caused by GNAS Gene Mutation (DeltaN377), Crozon-like Craniosynostosis, and Severe Trauma-induced Bleeding", *Am J Medical Genetics A.*, 2009, **149A**, 1487-93 (**IF 2.555**)

G. Bardini, CM. Rotella, S. Giannini, IA. Harsch and **A. Weimann**, „A link between

hyperlipidemia and lithium? Confirmation of a recent previous observation“, Metabolism, 2009, **58**, 735-737 (**IF 3.894**)

T. Bergmann, EG. Hahn, IA. Harsch and **A. Weimann** "Lithium – a role in hyperlipidemia", Metabolism, 2007, **56**, 583-5 (**IF 3.894**)

Reviews (IF 0,473)

A. Weimann, K. Weimann and A. Lun. "Hämatologische Veränderungen in der Intensivmedizin - Das erweiterte Blutbild", AINS, 2009, **44**, 164-170 (**IF 0.473**)

Buchbeiträge

Jäckel A, Hrsg. Telemedizinführer Deutschland 2009. **Weimann A**, Autor. Implementation eines Kosten-effektiven, konsolidierten und verbesserten telehämatologischen Services der drei Universitätskrankenhäuser der Charité Universitätsmedizin Berlin. Bad Nauheim: Medizin Forum AG; 2009: 112–116

12 Danksagung

Mein Dank gilt meinen beiden Mentoren, Professor Eckart Köttgen und Professor Rudolf Tauber, sowie allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, die mir kontinuierlich mit kompetenter Unterstützung zur Seite standen.

Für die fruchtbare Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Mathias Zimmermann und meinen klinischen Kooperationspartnern, insbesondere bei Dr. Malte Cremer und Frau Professor Claudia Spies bedanken.

Desweiterhin gilt mein Dank Dr. Michael Schäfer und Dr. Joachim Linssen, die mir mit ihren Ideen und Hinweisen wertvolle Einblicke in die Welt der Fluoreszenz-Flowzytometrie eröffneten.

Meinen Eltern möchte ich für ihre lebenslange Unterstützung danken und schließlich gebührt mein größter Dank meiner Frau Dr. Karin Weimann für ihr Verständnis und jeglichen Beistand, auf dem Weg zur Anfertigung dieser Arbeit.